

Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie an der
Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz

HISTAMINFREISETZUNG UND
MASTZELLDEGRANULATION BEI HUND UND SCHWEIN
DURCH CHEMISCHE HISTAMINLIBERATOREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

BERND HOERKENS
—
aus Seiffen

Marburg 1976
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie an der
Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz

HISTAMINFREISETZUNG UND
MASTZELLDEGRANULATION BEI HUND UND SCHWEIN
DURCH CHEMISCHE HISTAMINLIBERATOREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

BERND HOERKENS

aus Seiffen

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am17.12.76

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. W. Lorenz

Correferent: Prof. Dr. H. Hamelmann

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
 - 1.1. Historisches
 - 1.2. Zur Pharmakologie und Physiologie
 - 1.3. Mastzellen des Hundes
 - 1.4. Mastzellen beim Schwein
 - 1.5. Ziel der Arbeit
2. MATERIAL UND METHODIK
 - 2.1. Material
 - 2.1.1. Versuchstiere
 - 2.1.2. Pharmaka
 - 2.1.3. Reagenzien
 - 2.2. Experimentelle Modelle
 - 2.2.1. Histaminfreisetzung durch Cremophor El beim Hund und Anfärbung der Histaminspeicher durch Toluidinblau-Lösung
 - 2.2.2. Isolierung von Histamin aus Extrakten von Geweben
 - 2.2.3. Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 (Lorenz et al. 1970)
 - 2.2.4. Fluorometrische Bestimmung
 - 2.3. Fixieren der entnommenen Gewebe
 - 2.3.1. Toluidinblaufärbung modifiziert nach Reimann (1973)
 - 2.3.2. Bestimmung der Mastzelldichte im Gewebe (Lorenz et al. 1969)
 - 2.4. Statistik
3. ERGEBNISSE
 - 3.1. Klinische Symptome beim Hund nach Injektion von Cremophor El und makroskopische Betrachtung
 - 3.1.2. Histaminfreisetzung beim Hund durch Cremophor El (Tab. 1)
 - 3.1.3. Mikroskopische Befunde
 - 3.1.4. Mastzellgehalt von verschiedenen Geweben des Hundes nach Cremophorbehandlung (Tab. 2)

- 3.1.5. Mikroskopische Befunde der Toluidinblaufärbung
- 3.2. Klinische Symptome und Reaktionen beim Schwein nach Injektion von 48/80
- 3.2.1. Histamingehalt in Geweben des jungen Schweines nach Injektion von Compound 48/80 (Tab. 3)
- 3.2.2. Histochemische Beurteilung der Mastzellen des Schweines (Tab. 4)
- 3.2.3. Mikroskopische Befunde der Toluidinblaufärbung
4. DISKUSSION
- 4.1. Allgemeines
- 4.2. Histaminfreisetzung beim Hund durch Cremophor El unter Mitbeteiligung der Histaminspeicher
- 4.3. Histaminfreisetzung beim Schwein unter Mitbeteiligung der Histaminspeicher
5. ZUSAMMENFASSUNG
6. LITERATURVERZEICHNIS

HISTAMINFREISETZUNG UND MASTZELLDEGRANULATION BEI
HUND UND SCHWEIN DURCH CHEMISCHE HISTAMINLIBERATOREN

1. EINLEITUNG:

1.1. Historisches

1877 entdeckte Paul Ehrlich Zellen, denen er den Namen MASTZELLEN gab, da er die Vorstellung hatte, daß es sich bei den mit basischen Farbstoffen angefärbten Granula um gespeicherte Nährstoffe handelte. Diese Zellen färben sich mit Farbstoffen wie Toluidinblau, Methylenblau, Astrablau u. a. metachromatisch, d. h. sie haben einen Farbumschlag gegen den kurzwelligen Bereich.

1937 waren es Jorpes, Holmgren und Wielander, die die metachromatische Substanz der Mastzellgranula als Heparin identifizierten.

1953 konnten Riley und West zeigen, daß Mastzellen, Histamingehalt und Heparingehalt vieler Gewebe parallel anzutreffen sind.

Nach intraperitonealer Gabe des Histaminfreisetzers 48/80 (Abb. 1), einem Kondensationsprodukt von p-Methoxy-phenyläthylmethylamin mit Formaldehyd, konnte Fawcett (1955) zeigen, daß bei Ratten eine Entgranulierung der Mastzellen im Mesenterium und Netz auch zu einem starken Anstieg des Histamingehaltes in der Peritonealflüssigkeit führt.

Diese Wirkung bestätigten auch Feldberg und Talesnik (1953), die bei Ratten durch i. p. -Injektion des Histaminfreisetzers 48/80 starkes Ödem der Ohren, der Schnauze und der Pfoten sowie Zyanose hervorriefen.

1.2. Zur Pharmakologie und Physiologie

An pharmakologischen Wirkungen des Histamins sind unter anderem die Stimulierung der Sekretion exogener Drüsen, Erregung glatter Muskulatur sowie die Blutdrucksenkung im peripheren Kreislauf bekannt. Seine physio-

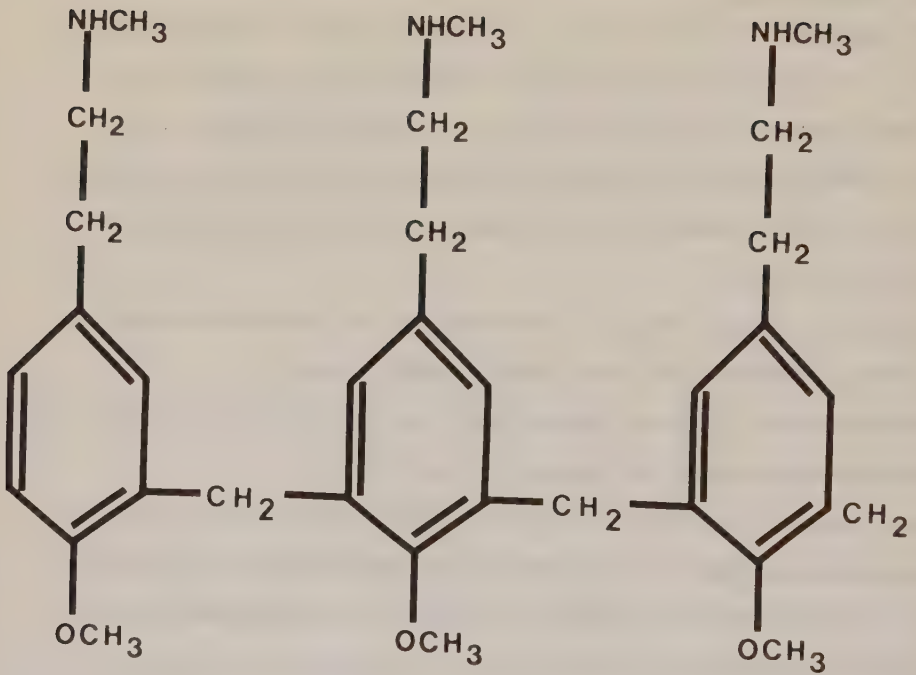


Abb. 1

Der Histaminliberator 48/80 ist ein Kondensationsprodukt von p-Methoxy-phenyläthylmethylamin mit Formaldehyd.

logische Wirkung zu erklären, ist deshalb von Schwierigkeit, weil Histamin ubiquitär vorkommt und nicht auf bestimmte Organe oder Speicherorte begrenzt ist, wie dies bei anderen Hormonen der Fall ist. Somit sind auch keine spezifischen Ausfallserkrankungen bekannt, wie dies z. B. nach Entfernung einer endokrinen Drüse zu erwarten wäre. Auch blieben Versuche, Mangelercheinungen durch Gabe einer histaminfreien oder -armen Diät zu erzeugen, bisher erfolglos.

Bis zum heutigen Tag konnte eine physiologische Funktion des Histamins im Verdauungstrakt nicht gefunden werden, obwohl die hohe Konzentration von Histamin in den verschiedenen Organen des Gastrointestinaltrakts schon lange bekannt ist. So wurden bisher viele Hypothesen aufgestellt, wie die von Code, der schon 1956 formulierte, daß der universelle, finale Chemo-stimulator für die Magensaft- und Säuresekretion Histamin sei. Als entscheidende Voraussetzung für diese Hypothese wird die Anwesenheit von Histamin in der Magenwand bei allen Tierspezies gefordert.

1. 3. Mastzellen des Hundes

Mastzellen konnten beim Hund durch Toluidinblau angefärbt werden und bereits 1953 fanden Feldberg und Talesnik, daß nach Gabe von 48/80 Histamin beim Hund aus Mastzellen der Haut freigesetzt wird, jedoch konnte aus der Magenschleimhaut kein Histamin liberiert werden. Die unterschiedliche Organ- bzw. Gewebsmanifestation der Histaminfreisetzung durch verschiedene basische oder hochmolekulare Stoffe, warfen die Frage einer Einteilung der Histaminspeicher auf, die eng mit der physiologischen Funktion des Histamins verbunden sein müßte: 1966 unterteilten Brodie und Mitarbeiter die Histaminspeicher in Mastzell- und in Nichtmastzellspeicher, d.h. Zellen,

die zwar Histamin speichern, aber histologisch gesehen keine Mastzellen sind.

Lorenz et al. (1969) und Reimann (1973) konnten nachweisen, daß die Mastzellen des Magen-Darmtraktes des Hundes überwiegend atypische Mastzellen und nur zu 20% typische Mastzellen sind. Die Untersuchung von Enerbäck (1966), Hakanson et al. (1967) und Lorenz et al. (1968, 1969, 1969 b) führten zur Umbenennung der "Nichtmastzellspeicher" in "unspezifische Mastzellspeicher" und in "gewebsspezifische Histaminspeicher". Es stellte sich nämlich heraus, daß es atypische Mastzellen gibt, die sich histochemisch und biochemisch wie die von Brodie und Mitarbeiter bezeichneten Nichtmastzellspeicher verhalten.

1.4. Mastzellen beim Schwein

Lorenz et al. (1971, 1971 a) und Reimann (1973) konnten zeigen, daß nach i. v. Applikation von 48/80 der Histamingehalt im Magen- und Darmtrakt des Schweines sehr stark abfällt. Die Frage war, woher kommt dieses Histamin, gibt es Speicher, aus denen es bei Bedarf freigesetzt werden kann? Riley und West (1956) waren sogar der Meinung, daß es sich hier um nichtmastzellgespeichertes Histamin handeln müsse, da man nicht in der Lage war, Mastzellen in der Magenschleimhaut und Darmschleimhaut des Schweines sichtbar zu machen.

1.5. Ziel der Arbeit

Es sollte versucht werden, mehr Klarheit über die Histaminspeicher, die Mastzellen, herauszufinden. Daher wurde die einfache Methode angewandt, Mastzellen durch Toluidinblau sichtbar zu machen.

Beim Hund war diese Aufgabe einfach zu lösen, weil das Anfärben der Mastzellen keinerlei Problem stellte. Die Frage war, kann beim Hund aus dem Gastrointestinaltrakt das Histamin liberiert werden? Wenn ja, müssen "Speicherzellen" hierfür vorhanden sein.

Mit Cremophor El (Abb. 2) fand sich ein Stoff, der beim Hund zum Teil recht heftige Kreislaufreaktionen wie Blutdruckabfall, Bronchospasmus, Zyanose und Rötung verschiedener Hautareale auslöste. Cremophor wird als Lösungsvermittler vieler injizierbarer Arzneimittel verwendet, so z.B. bei Propanidid (Epontol^R), Althesin und Marcumar^R.

Da es nach Gabe von Cremophor El zu einer Abnahme des Histamingehaltes in verschiedenen Geweben kam (Lorenz et al. 1973), sollte die Mastzell-dichte in diesen Geweben ebenfalls bestimmt werden. In zwei großen experimentellen Serien wurden die Mastzellspeicher beim Hund nach Gabe von Cremophor El histologisch beurteilt.

Beim Schwein war es nicht gelungen, mit einer normalen Formalinfixierung und anschließender Toluidinblaufärbung, die Histaminspeicher - die Mastzellen - in den verschiedenen Organen, speziell in der Mucosa des Magen und Darmes, anzufärben. Erst durch Änderung der Fixierung (anstelle der herkömmlichen Formolfixierung wurde Carnoy bzw. Susa-Lösung verwandt) gelang es, die Mastzellspeicher im Gastrointestinaltrakt sichtbar zu machen. Lorenz et al. (1971 a), Reimann (1973).

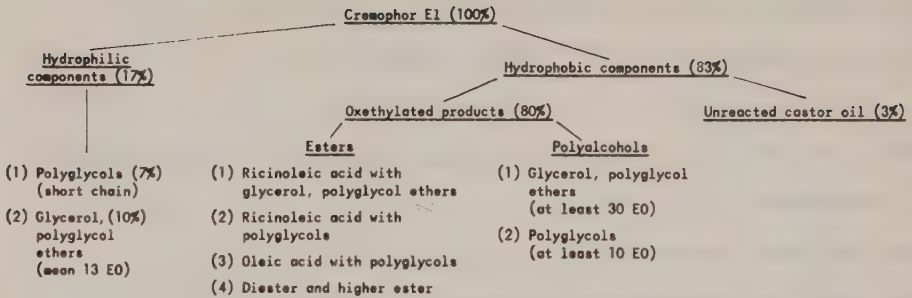


Abb. 2

Cremophor - Lösungsvermittler vieler fettlöslicher injizierbarer Arzneimittel, in seine einzelnen Bestandteile aufgeteilt. (Nach Lorenz).

2. MATERIAL UND METHODIK:

2.1. Material:

2.1.1. Versuchstiere

Schwein: Deutsches Edelschwein, 100 - 150 kg, beiderlei Geschlechts.

Hund: Bastard-Hund, 20 - 40 kg, beiderlei Geschlechts.

Bei Schwein und Hund wurden die Organe nach Narkotisierung mit Pento-
barbital (10 - 25 mg/kg i. v.) und nach arteriellem Entbluten entnommen.

2.1.2. Pharmaka

Compound 48/80 (Fa. Burroughs Welcome) Natriumpentobarbital (Nembutal^R
Abbott). Cremophor El: besteht zu 84% aus ORPE und zu 16% aus einer
hydrophilen Mischung von Polyglycolen und Glycerin - Polyglycoläthern
(BASF, Ludwigshafen).

2.1.3. Reagenzien

Histamindihydrochlorid

O-Phthaldialdehyd (umkristallisiert in Petroläther, S.P. 40 - 70 Grad C)
(Fluka, Buchs) Methanol, Heptan, Butanol, Dowex 50 WX 8, H⁺, 200 - 400
Mesh (SERVA, Heidelberg).

Entellan, Formalin, Kanadabalsam, Caedax, Trichloressigsäure, Sublimat,
Chloroform, Eisessig (Merck, Darmstadt), Toluidinblau (Merck) Art. 1273.
Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur doppelt destilliertes Wasser ver-
wendet.

Trispuffer für biochemische Bestimmungen (Boehringer & Söhne, Mannheim).
Toluidinblau (Merck, Darmstadt und Gurrs, London).

Bleiacetat (Riedel de Haen AG).

Eukitt (Hecht-Mertens, Kiel).

2.2. Experimentelle Modelle:

Histaminfreisetzung durch 48/80 beim Schwein und Anfärbung der Histaminspeicher mit Toluidinblau:

Die Histaminfreisetzung durch 48/80 wurde bei Schweinen in einem 3-Tage-Versuch untersucht. Die Tiere bekamen über diesen Zeitraum 3 mg/kg 48/80 i.m., jeweils zur gleichen Tageszeit, das letztmal 15 Minuten präoperativ. Die Tiere wurden über die arteria carotis und femoralis entblutet und folgende Organe wurden innerhalb von 3 Minuten herausgenommen: Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Rektum, Leber, Milz, Lunge, Niere, Nebenniere und Pankreas.

Von den etwa 2 - 3 g schweren Organstücken wurde jeweils sofort 1 g abgewogen und homogenisiert mit 9 Teilen 0,4 M HClO_4 , die Reste der Organstücke wurden in spezielle Fixationslösungen gelegt (s. unten).

2.2.1. Histaminfreisetzung durch Cremophor El beim Hund im Gewebe und Anfärbung der Histaminspeicher durch Toluidinblau-Lösung

Nach der Versuchsanordnung von Reimann (1973) stellten wir uns die Frage, was mit den Histaminspeichern nach Gabe von Cremophor El erfolgt. Wir suchten Hundepärchen, d.h. Tiere aus einem Wurf, mit ungefähr 20 kg Körpergewicht, die älter als 1 Jahr waren. Die Tiere erhielten Cremophor über 3 Tage in steigender intravenöser Dosis: am 1. Tag 2 ml/kg Körpergewicht, am 2. Tag 4 ml/kg Körpergewicht und am 3. Tag 6 ml/kg Körpergewicht. Diese Behandlung sollte der bei akuten Versuchen gefundenen Tachyphylaxie Rechnung tragen. Ein Geschwistertier wurde als Kontrolltier verwendet und bekam an Stelle von Cremophor physiologische Kochsalzlösung mit Phosphatpuffern in entsprechend zunehmendem Volumen. Acht Stunden

nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit Pentobarbital (Nembutal^R individuelle Dosis) narkotisiert. Die Tiere wurden durch Entbluten getötet. Unmittelbar danach wurden die Gewebe für die Histaminbestimmung und Mastzellzählung entnommen, wobei die Gewebsstücke in entsprechende Fixationslösungen (Formalin, Bleiacetat, Susa und Carnoy) gelegt wurden.

2.2.2. Isolierung von Histamin aus Extrakten von Geweben

Extraktion von Histamin aus Geweben zur fluorometrischen Bestimmung:

Die Gewebsstücke wurden mit 9 Teilen 0,4 M HClO_4 mit dem Ultra-Turax homogenisiert, für 30 Minuten bei 4.000 G zentrifugiert und 4 ml des Überstandes zur Histaminbestimmung verwendet.

2.2.3. Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 (Lorenz et al. 1970)

Die 4 ml des Perchlorsäureüberstandes der Gewebe wurden mit 5 M NaOH und 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 auf pH 6,5 an der Glaselektrode eingestellt und auf eine kleine Säule mit Dowex 50 WX 8, H^+ (0,3 x 2 cm) aufgetragen und mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 equilibriert.

Die Säulen wurden der Reihe nach mit 5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) 1,0 ml bidestilliertem Wasser und 5,0 ml 1 M HCl gewaschen.

Histamin wurde mit 3,0 ml 4 M HCl eluiert. Ausbeute 90 - 100%, Variationskoeffizient 4,2%.

2.2.4. Fluorometrische Bestimmung

Zur fluorometrischen Bestimmung des Histamins wurde das Eluat mit einem gleichen Volumen bidestilliertem Wasser verdünnt. 1 ml dieser Lösung wurde mit 0,5 ml 5 M NaOH und 0,1 ml o-phthaldialdehydlösung (1% W/V) in Methanol gemischt. Nach 2 Minuten wurden 1,0 ml 1 M H_3PO_4 zugegeben und die Fluoreszenz bei $21 \pm 0,5$ Grad C in einem Zeiss-Spektrofluorometer gemessen, Anregung bei 360 nm, Fluoreszenz bei 450 nm. Die Fluoreszenzintensität war der Histaminkonzentration in einem Bereich von 10 - 700 ng Histamindihydrochlorid pro ml verdünntes Eluat direkt proportional.

2.3. Fixieren der entnommenen Gewebe:

Jeweils 2 - 3 g Gewebe wurde nach der Histaminliberation durch 48/80 bzw. Cremophor El von den jeweiligen Organen entnommen. Ein Gramm davon wurde zur Histaminbestimmung verwendet, die beiden unmittelbar angrenzenden Teile für die Zählung der Mastzellen entnommen und teils in Bleiacetat, in Formalin, in Carnoy oder in Susa fixiert. Nach dem Fixieren in Bleiacetat 6 - 8 Stunden, in Formalin bis 12 Stunden, wurden die Gewebsstücke im Autotechnikon (Fa. Technikon, Irland) entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den formalinfixierten Gewebsstückchen wurden ungefähr 5 μ dicke Schnitte am Mikrotom (Jung) angefertigt. Von dem mit Bleiacetat fixierten Gewebsstückchen sollte dagegen eine Schnittdicke von 3 μ erzielt werden (modifiziert nach der Technik von Burck 1966). Die erhaltenen Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen. Die formalinfixierten Schnitte wurden mit Haemalaun-Eosin, die in Bleiacetat fixierten Gewebe mit Toluidinblau gefärbt (Doppelfärbung, Haemalaun-Eosin nach

Romeis, 1968). Die HE-Färbung diente uns zur diagnostischen Kontrolle und der Fragestellung einer histologischen Veränderung. So z. B. im Sinne einer entzündlichen Reaktion. Die 5 μ dicken Schnitte wurden nach Entparaffinierung für 10 Minuten in der Haemalaunlösung belassen, dann gründlich in Leitungswasser gespült. Der dritte Schritt war die mäßige Überfärbung in einer 0,1%-igen Lösung von Eosin für 60 sec. Darauf kurzes Abspülen in destilliertem Wasser. Danach Differenzieren in der aufsteigenden Alkoholreihe, 70%-igem, 96%-igem und absolutem Alkohol (Kliniksapotheke) für jeweils 3 Minuten.

Anschließend Eindecken der Schnitte mit Kanadabalsam, Entellan oder Eukitt.

2.3.1. Toluidinblaufärbung modifiziert nach Reimann (1973):

Mit der Toluidinblaufärbung wurden die Mastzellen im Gewebe sichtbar gemacht. Toluidinblau 0,1% (Fa. Merck und Gurrs, London) wurde mit 0,1 M Zitratpuffer auf pH 4,0 eingestellt. Die 5 μ dicken Schnitte wurden entparaffiniert und nach 10-stündigem Suspendieren in 70%-igem Alkohol für jeweils exakt 5 Minuten nacheinander in zwei mit destilliertem Wasser gefüllte Küvetten getaucht. Dort kamen sie für 5 - 10 Minuten in die zuvor beschriebene Toluidinblaulösung. Durch 3 - 5-maliges Spülen in einem Leitungswasserbad wurde die überflüssige Farbe abgespült, eine Überfärbung durch kurzes Belassen in bidestilliertem Wasser verhindert. Die Schnitte gelangten zur Differenzierung und Entwässerung, und danach in drei hintereinander gesetzte Küvetten mit Isopropylalkohol. Danach wurden die Schnitte in Xylol gestellt und konnten nun in feuchtem Zustand mit Kanadabalsam eingedeckt werden.

2.3.2. Bestimmung der Mastzelldichte im Gewebe (Lorenz et al. 1969)

Die mit Toluidinblau gefärbten Mastzellen in den 5 μ dicken Schnitten wurden bei einer 250-fachen Vergrößerung in jeweils 25 Feldern mittels Zählgitter-Okular (Fa. Leitz) auf einer Gesamtfläche von 0,47 qmm ausgezählt. Die Mastzelldichte wurde als Anzahl der Zellen pro 25 Felder angegeben.

2.4. Statistik

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Student's-t-Test für unpaare Daten und für gepaarte Daten berechnet (Snedecor und Cochran 1967). Für die Berechnung wurde ein Olivetti Tischcomputer (Programm 102) verwendet.

3. E R G E B N I S S E :

3.1. Klinische Symptome beim Hund nach Injektion von Cremophor El und makroskopische Betrachtung

Alle Tiere, denen im wachen Zustand Cremophor injiziert wurde, zeigten Benommenheit, Prostration und starken Juckreiz (Kratzen, Scheuern). Massive Rötung der Haut, so am Bauch, an der Unterseite des Halses, unter den Achseln, im retroaurikulären Bereich sowie am Anus. 5 - 10 Minuten nach Injektion von Cremophor El kam es zu wässrig-galligen Durchfällen. Bei der Autopsie fielen hämorrhagische Erosionen in Magen und Darm und gleichzeitig eine zyanotische Verfärbung des Darmes auf. Die Leber war dunkelbraunrot verfärbt und von der Schnittfläche ließ sich vermehrt Blut abpressen. Die Läppchenzentren sind rot und kreisförmig. Der Thoraxraum wurde von der Lunge teilweise ausgefüllt; die Lunge ist etwas schwerer als normal. Der Fingereindruck hinterläßt eine Delle im Gewebe. Beim Einschneiden läuft bei Druck eine schaumig-rötliche Flüssigkeit ab. Es liegt somit ein wenn auch geringgradiges Lungenödem vor. Die Nieren sind geringgradig vergrößert, dunkelrot, von fester Konsistenz. Die Papillen sind auf der Schnittfläche dunkelrot, was alles für eine akute Stauungsniere spricht.

3.1.2. Histaminfreisetzung beim Hund durch Cremophor El (Tab. 1)

Cremophor, ein Netzmittel, wird in der Medizin als Lösungsvermittler verschiedener schlecht wasserlöslicher Arzneimittel verwendet. Es besteht aus einem Gemisch hydrophober und hydrophiler Komponenten. Wie Lorenz (1972) und Reimann (1973) zeigen konnten, erwies sich das

Cremophor El bei Hund und Katze nach intravenöser Applikation als Histaminliberator, nicht dagegen bei Mensch, Schwein, Kaninchen und Ratte. Beim Hund war diese Histaminfreisetzung so stark, daß sich schwere arterielle Hypotensionen bei den meisten Versuchstieren einstellten. Es kam zum Anstieg der Histaminkonzentration im Vollblut. Gewebe, aus denen Histamin durch Cremophor freigesetzt wurde, unterschieden sich von denen anderer Histaminliberatoren. Eine erhöhte Histaminkonzentration konnten Lorenz und Mitarbeiter im Blut über 1 Stunde lang nachweisen. Außerdem kam es zur Sekretion eines stark sauren Magensaftes. Zur Klärung der Frage, aus welchen Organen oder Geweben die Histaminfreisetzung durch Cremophor erfolgte, injizierten wir Hunden an drei verschiedenen Tagen steigende Dosen Cremophor El. Es wurden nur Tierpaare aus dem gleichen Wurf verwendet. Sie erhielten am 1. Tag i. v. 2 ml/kg Körpergewicht, am 2. Tag 4 und am 3. Tag 6 ml/kg Körpergewicht. Damit wurde der akut gefundenen Tachyphylaxie Rechnung getragen. 6 - 8 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit Pentobarbital narkotisiert, entblutet und die Gewebe zur Histaminbestimmung entnommen. Interessanterweise zeigte die Magenschleimhaut eine Abnahme des Histamingehaltes um 50%, während die Magenmuskulatur nur im Antrum-bereich um 50% abnahm. Der Darm zeigte eine Abnahme im Jejunum von 45%, Ileum und Colon um 85%. Nur in der Bauchhaut konnte eine starke Abnahme des Histamingehaltes nachgewiesen werden. Dieses Verteilungsmuster der Organe bei der Histaminfreisetzung durch Cremophor wäre teilweise nach der Injektion von d-Tubocurarin ähnlich, wie es z. B. von Mac Intosh und Paton 1949 beschrieben wurde.

Organ oder Gewebe	Histamingehalt in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht ($\bar{X} \pm \text{S.D.}$)		Abnahme (%)	Signifikanz
	unbehandelt	behandelt		
Bauchhaut	20.5 ± 6	3 ± 0.2	89	$p < 0.001$
Magenschleimhaut:				
Fundus	156 ± 6	79 ± 36	51	$p < 0.001$
Corpus	111 ± 38	68 ± 27	39	$p < 0.001$
Antrum	125 ± 17	45 ± 15	64	$p < 0.001$
Magenmuskulatur:				
Fundus	40.8 ± 12.6	40.1 ± 9.5	--	--
Corpus	39.0 ± 12.7	36.0 ± 12.7	8	--
Antrum	28.9 ± 5.5	13.0 ± 7.1	54	$p < 0.005$
Jejunum	123 ± 10.2	56 ± 23	47	$p < 0.001$
Ileum	84 ± 17	57 ± 19.4	32	$p < 0.001$
Colon	75 ± 19.4	45 ± 17.6	39	$p < 0.001$
Lunge	89 ± 27.2	86 ± 22.7	--	--
Leberparenchym	85 ± 21	54 ± 14	37	$p < 0.001$
Pankreas	11.4 ± 3.6	2.8 ± 2.1	75	$p < 0.001$
Gl.submandibularis	31.9 ± 9.8	23.2 ± 5.3	27	$p < 0.05$
Gl.parotis	7.4 ± 1.7	5.8 ± 1.5	22	$p < 0.05$

Tabelle 1

Histaminfreisetzung in Organen und Geweben des Hundes durch Cremophor El.
Untersucht wurden 6 Paare aus demselben Wurf.

3.1.3. Mikroskopische Befunde

Die histologische Betrachtung der Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitte ergab wie bereits in der makroskopischen Beurteilung erwähnt, eine Leberstauung, ein akutes Lungenemphysem, eine akute Entzündung des Magen-Darmtraktes, die mit einer massiven Infiltration an eosinophilen Granulozyten einherging.

3.1.4. Mastzellgehalt von verschiedenen Geweben des Hundes nach Cremophorbehandlung (Tab. 2)

Die mit Toluidinblau angefärbten Mastzellen wurden mittels Zählgitter der Firma Leitz (Wetzlar) ausgezählt, um herauszufinden, ob die Mastzellzahl mit der Abnahme des Gewebshistamins korreliert.

Am deutlichsten war die Abnahme der Mastzellen in der Bauchhaut, mit ungefähr 90%. Weiterhin im Magenantrum mit 65% (Abb. 3), im Magenfundus mit 50%, das Histamin im Gewebe blieb jedoch gleich. Die Abnahme des übrigen Darmtraktes lag bei 40 - 50%. Die Abnahme des Histamins lief parallel mit der der Mastzellen. Während es in der Lunge zu keiner Abnahme des Gewebshistamins kam (Lorenz 1971), fand sich eine Abnahme der Mastzellen der Lunge um 40% (Abb. 4 und 5). Sehr gut überein stimmte der Histamingehalt (s. Lorenz et al. 1971) und die Mastzellzahl in der Leber (Abb. 6).

3.1.5. Mikroskopische Befunde der Toluidinblaufärbung

In allen Organen fand sich eine Abnahme des Mastzellgehaltes, so **interessanterweise** im Gastrointestinaltrakt, was früher bezweifelt worden war. **Histologisch** fiel dabei **speziell** im Magen auf, daß die mit Toluidinblau

Gewebe	Mastzellgehalt (Anzahl der Zellen/mm ²)			Abnahme (%)	
	unbehandelt	behandelt			
Bauchhaut	86 ± 39	11 ± 3	87		p < 0.001
Magen					
Fundus	156 ± 6	79 ± 36	51		p < 0.001
Corpus	111 ± 38	68 ± 27	39		p < 0.001
Antrum	125 ± 17	45 ± 15	64		p < 0.001
Jejunum	123 ± 10	66 ± 33	46		p < 0.001
Ileum	110 ± 14	59 ± 10	42		p < 0.001
Colon	84 ± 39	38 ± 18	52		p < 0.001
Leberparenchym	85 ± 21	54 ± 14	37		p < 0.001
Lunge	114 ± 49	68 ± 38	40		p < 0.001

Tabelle 2

Mastzellgehalt einiger Gewebe des Hundes nach Cremophor E1-Behandlung.
Ausgezählt mittels Zählgitter.



Abb. 3

Obersichtsaufnahme der ANTRUMSCHLEIMHAUT eines unbehandelten Hundes.

Die Mastzellen befinden sich in der Submucosa und in der Mucosa.

Bleiacetatfixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 120-fach.

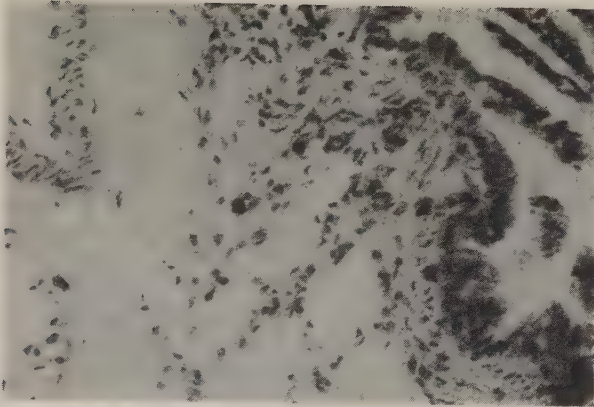


Abb. 4

Toluidinblaufärbung der LUNGE eines unbehandelten Hundes.
Die Mastzellen liegen vermehrt um Bronchialäste, und kommen
nur vereinzelt in den Alveolarsepten vor. Die Mastzellen
zeigen deutlich gefüllte Granula.

Bleiacetatfixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 300-fach.

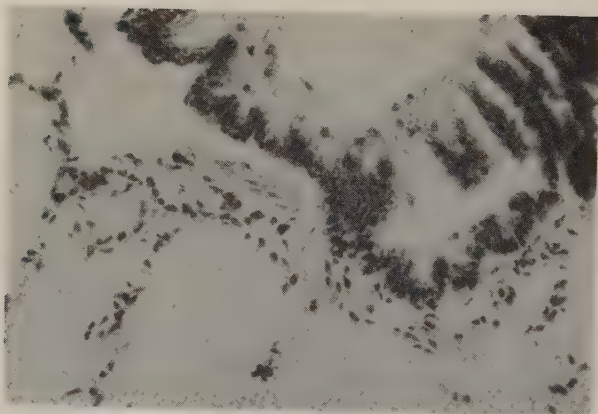


Abb. 5

LUNGE eines behandelten Hundes mit intravenöser Cremophor El-Injektion. Deutliche Abnahme der Mastzellzahl zur vorherigen Abbildung ersichtlich.

Bleiacetatfixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 300-fach.

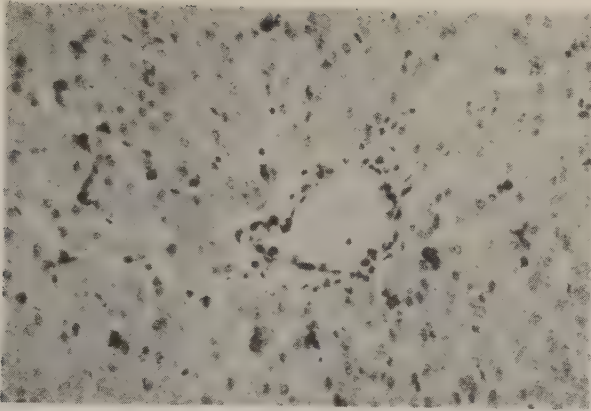


Abb. 6

LEBER eines unbehandelten Hundes. Mastzellen erscheinen prall gefüllt, um eine Zentralvene gelegen.
Bleiacetatfixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 300-fach.

angefärbten Mastzellen sowohl in der gefäß- und nervenreichen Submucosa als auch in der Mucosa gelegen sind. In der Lunge waren sie hauptsächlich um Bronchien und weniger in den Alveolen zu sehen; und in der Leber waren sie vermehrt um die Zentralvenen anzutreffen.

3.2. Klinische Symptome und Reaktionen beim Schwein nach Injektion von 48/80

Die Befunde von Lorenz et al. (1971) konnten reproduziert werden. Nach Gabe von 48/80 (Abb. 1), einem polymeren Aldolkondensat aus Formaldehyd und P-Methoxyphenyl-äthylmethylamin (Mac Intosh und Paton 1949) kam es beim Schwein zu einem steilen initialen Blutdruckanstieg und erst dann zu einem langanhaltenden Blutdruckabfall. Als weitere Besonderheit bei den Versuchen gab es einige Tiere, die nicht die erwarteten Kreislaufreaktionen zeigten, wie sie bei Versuchen am Hund beobachtet werden konnten.

Als weitere klinische Symptome nach 48/80-Injektion zeigten sich vermehrte Nasen- und Speichelsekretion, Hyperventilation, Bronchospasmus, petechiale Blutungen und Zyanose der Haut, z.T. Quaddelbildung. Bei Eröffnung des Bauchraumes wurde eine starke Hyperämie des Darmes gefunden.

3.2.1. Histamingehalt in Geweben des jungen Schweines nach Injektion von Compound 48/80 (Tab. 3)

Es wurde der Histamingehalt verschiedener Gewebe nach Injektion von 48/80 bei sechs jungen Schweinen untersucht. Die Tiere erhielten eine Injektion von 48/80 15 Minuten vor Versuchsbeginn. Die andere Gruppe erhielt eine Injektion von gleichen Volumina NaCl unter Einhaltung der

Gewebe	HISTAMINKONZENTRATION $\mu\text{g/g}$			Abnahme in %	Signifikanz
	NaCl-Injektion	nach 48/80-Injektion			
Oesophagus	15.2 $\pm$ 4.9	8.4 $\pm$ 2.9	45		p < 0.001
Magen - Fundus	40.3 $\pm$ 9.2	31.8 $\pm$ 7.8	21		p < 0.005
Magen - Corpus	56.2 $\pm$ 17.3	37.7 $\pm$ 11.0	33		p < 0.005
Magen - Antrum	42.4 $\pm$ 20.1	22.9 $\pm$ 11.9	46		p < 0.001
Duodenum	72.4 $\pm$ 28.7	32.6 $\pm$ 12.2	55		p < 0.001
Jejunum	67.2 $\pm$ 13.2	24.9 $\pm$ 6.2	63		p < 0.001
Ileum	53.2 $\pm$ 16.2	31.9 $\pm$ 7.1	40		p < 0.001
Rektum	16.0 $\pm$ 1.3	1.8 $\pm$ 1.0	89		p < 0.001
Lunge	61.2 $\pm$ 19.8	42.7 $\pm$ 13.2	30		p < 0.005
Gl.thyreoides	14.3 $\pm$ 7.5	12.9 $\pm$ 6.6	10		p < 0.05
Leber	9.2 $\pm$ 3.7	7.4 $\pm$ 3.0	20		p < 0.05
Pankreas	3.1 $\pm$ 1.6	0	100		
Niere	1.3 $\pm$ 0.4	0	100		
Nebenniere	1.7 $\pm$ 0.5	0	2		

Tabelle 3

Histaminkonzentration einiger Gewebe des Schweines - 6 Tiere erhielten NaCl - 6 Tiere 48/80-Injektion

Zeitverhältnisse. Es wurde der Histamingehalt in den Organen der behandelten Tiere mit den nichtbehandelten verglichen (Tab. 3). Der Histamingehalt der gesamten Leber nahm um 20% ab. Dies ist deutlich weniger als wir es von der Hundeleber kennen. Nach Angabe von Ojers et al. 1941; Copenhaver et al. 1953, und eigenen Befunden, setzt die Leber des Hundes mehr als 40% Histamin frei. Eine Histaminentspeicherung fanden wir auch in der Magenschleimhaut, sie ist im Antrum am größten. Vom Oesophagus bis zum Rektum fanden wir eine deutliche Abnahme des Histamingehaltes, der im Durchschnitt um 70 - 80% lag. Da Compound 48/80 als Histaminliberator der typischen Mastzellspeicher gilt, fanden wir im Schwein die erste Spezies bei der wir das meiste Histamin des Verdauungstrakts in typischen Mastzellspeichern finden. Eine geringe Histaminfreisetzung fanden wir nach 48/80-Gabe in der Thyreoidea, dem Pankreas, der Niere und der Nebenniere.

3.2.2. Histochemische Beurteilung der Mastzellen des Schweines (Tab. 4)

Riley und West 1956 nahmen an, daß das Histamin der Schweinemagenmucosa in Nichtmastzellspeichern lokalisiert ist. Sie hatten die Schweinemagenschleimhaut in 4%-igem Formalin fixiert, eine Toluidinblaufärbung gemacht, aber keine Mastzellen finden können. Der Histamingehalt, wie aus den biochemischen Messungen zu ersehen ist, hat im Magen-Darmtrakt des Schweins stark abgenommen. Das würde dafür sprechen, daß das Schwein als einzige Ausnahme unter den bekannten Säugern überwiegend "typische Mastzellen" im Magen-Darmtrakt besitzt.

Gewebe	Anzahl der Zellen/mm ²	nach 48/80-Injektion	Abnahme (%)	Signifikanz
Oesophagus	34 ± 12	17 ± 6	50	p < 0.001
<u>Magen</u>				
Schleimhaut	156 ± 26	118 ± 21	24	p < 0.001
Muskel	98 ± 17	57 ± 20	42	p < 0.001
Duodenum	64 ± 19	31 ± 7	52	p < 0.001
Jejunum	166 ± 31	76 ± 21	54	p < 0.001
Ileum	112 ± 11	69 ± 9	38	p < 0.001
Rektum	78 ± 34	13 ± 6	83	p < 0.001
Lunge	178 ± 54	111 ± 37	38	p < 0.005
Parenchym	54 ± 16	42 ± 11	22	p < 0.05
Leber				
Kapsel	98 ± 21	76 ± 19	24	p < 0.02
Pankreas	12 ± 3	2 ± 1	83	p < 0.001
Niere	18 ± 4	16 ± 3	11	p < 0.2
Bauchhaut	84 ± 11	12 ± 3	86	p < 0.001

Tabelle 4

Mastzellgehalt einiger Gewebe des Schweines vor und nach 48/80-Injektion.

n = 12 Paare.

Es gelang auch uns nicht, Mastzellen in den mit Formalin oder Bleiacetat fixierten Geweben anzufärben. Erst mit einem Fixiergemisch wie Susa oder Carnoy konnten die Mastzellen sichtbar gemacht werden. Wie schon Lorenz et al. (1971) und Reimann (1973) zeigen konnten, gelingt dies am besten mit Carnoy'scher Lösung.

2 - 3 mm dicke Gewebsstücke wurden 3 Stunden fixiert, anschließend mit 0,2%-igem Toluidinblau bei pH 4,0 gefärbt. Sichtbar wurden violett angefärbte Mastzellen bzw. bei den mit 48/80 behandelten Tieren degranulierte Mastzellen.

3.2.3. Mikroskopische Befunde der Toluidinblaufärbung

Zahlreiche Mastzellen fanden wir in der Magencorpusgegend, in der Muscularis mucosa und einige in der Nähe der Becherzellen (Abb. 7). Auch die tieferen Schichten der Pylorusdrüsen waren reich an Mastzellen. Nach 48/80-Gabe kam es zu einer deutlichen Abnahme der Mastzellen im Mucosabereich, während in der Submucosa noch deutlich Mastzellen zu erkennen sind (Abb. 8). Bei stärkerer Vergrößerung ist deutlich die Lage der Mastzellen einmal zu den Parietalzellen bzw. Brunner'schen Drüsenzellen im Duodenum (Abb. 9) bzw. zu den kleinen Gefäßen zu erkennen (Abb. 10). Im Duodenum fanden wir die Mastzellen in der Nähe der Brunner'schen Drüsen. Sehr zahlreich war die Mastzellen in allen Schichten des Darmes gelegen. Dagegen fanden sich jedoch sehr wenig Mastzellen in der Leber, besonders wenig im Parenchym, etwas mehr dagegen in der Leberkapsel.

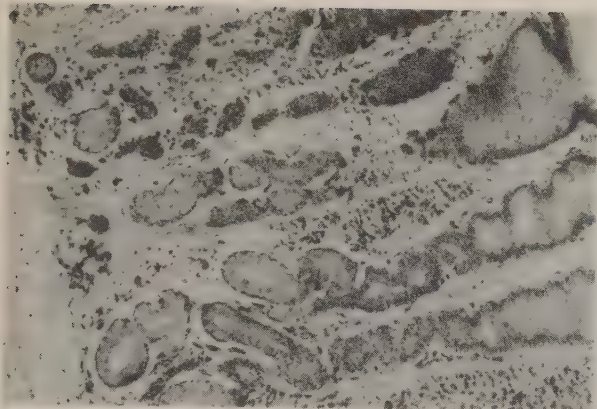


Abb. 7

MAGEN-CORPUS eines unbehandelten Schweines in der Übersichtsaufnahme. Es sind deutlich Mastzellen sowohl in der Mucosa, als auch Submucosa zu erkennen.

Carnoy'sche Fixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 30-fach.



Abb. 8

Deutliche Abnahme der Mastzellen nach 48/80-Behandlung des Schweines in der MAGEN-CORPUS-MUCOSA, während in der Submucosa noch Mastzellen zu erkennen sind.
Carnoy'sche Fixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 30-fach.

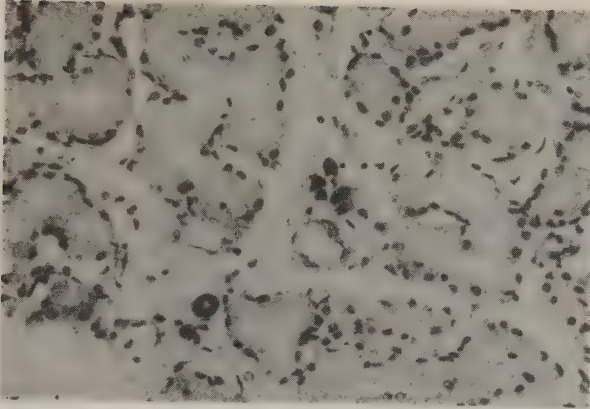


Abb. 9

Lage der Mastzellen in der Mucosa des DUODENUMS in der Nähe von Gefäßen bzw. Brunner'schen Drüsenzellen.
Carnoy'sche Fixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 400-fach.



Abb. 10

Mastzellen der SUBMUCOSA des Schweinemagens in der Nähe von Gefäßen.

Carnoy'sche Fixierung, Toluidinblaufärbung.

Vergrößerung 400-fach.

4. DISKUSSION:

4.1. Allgemeines

Nach Uvnäs und Mitarbeitern (1971) befindet sich in den Mastzellen nicht nur Histamin, sondern Protein ungefähr 60%, Heparin 30%, Histamin ungefähr 10%, Serotonin 0,3%, Phospholipoide 1 - 2% und ATP ungefähr 0,2%. Wie bereits Werle und Amman 1955 und 1956 zeigten, wird Histamin in vitro an den Heparinkomplex gebunden. Diese Bildung des Heparin-Histaminkomplexes geht über eine Ionenbindung zwischen den beiden Aminogruppen des Histamins und der Estersulfatgruppen-OSO₃⁻ NHSO₃⁻ des Heparins (Abb. 11). Uvnäs und Mitarbeiter wiesen nach, daß nur sehr wenig Histamin an Heparin gebunden wird, vielmehr in vivo der Proteinkomplex (der größte Anteil in der Mastzelle) Histamin ohne Beteiligung des Heparins binden kann (Abb. 12).

Wie wird jetzt dieses Histamin, das sich in den Granula befindet, aus der Mastzelle freigesetzt? Beobachtungen von Röhlich aus der Arbeitsgruppe Uvnäs führten zu der Erklärung, daß die Freisetzung von Histamin aus diesem Komplex durch einen einfachen Ionenaustausch möglich sein kann, und zwar zwischen Histamin in den Granula und den Kationen der Extrazellulärflüssigkeit. Dieselbe Beobachtung machten Lagunoff und Uvnäs. Die Granula sind von der Extrazellulärflüssigkeit durch eine Perigranula und eine Plasmamembran abgeteilt. Die Membran kann zum Ein- und Ausstrom von Histamin durchlässig werden bzw. die Granula können nach außen entleert werden. Die Mechanismen, die zur Durchlässigkeit der Membran führen, können einmal zelltoxische Stoffe sein, auch Kälte oder die Wirkung von gewissen Pharmaka, wie z. B. Compound 48/80 oder Anti-

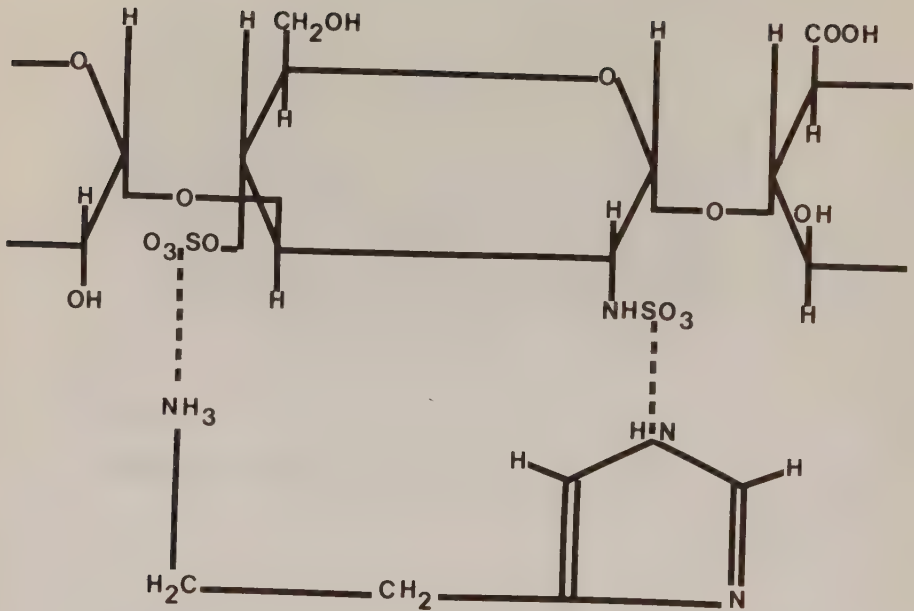


Abb. 11

Bildung des Heparin-Histaminkomplexes durch Ionenbindung zwischen den Aminogruppen des Histamins und der Estersulfatgruppen des Heparins in vitro.

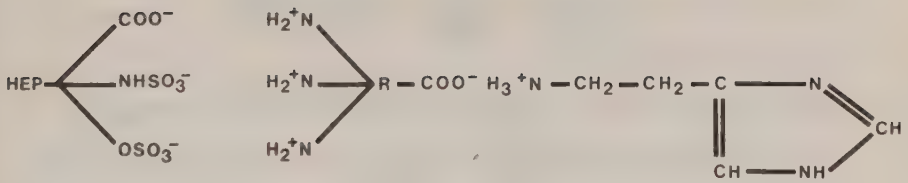


Abb. 12

Innerhalb des Mastzellgranulums ist das Histamin grōßtenteils an den Proteinkomplex gebunden.

gene. Bei Degranulationsvorgängen, bei denen Granula in den extrazellulären Raum gestoßen werden, bleibt die Zelle intakt (Johnsen) und fähig, diesen Vorgang beliebig zu wiederholen, wenn die Stoffe durch Synthese erneuert werden (Fawcett; Padawer). Douglas und Rubin formulierten diesen Vorgang als "stimulus-secretion-coupling". Ein Ausstoßen der gespeicherten Substanzen geht nur durch Auspressen der intakten Granula vor sich, so daß die Stoffe, die ebenfalls innerhalb der Granula sind, gleichzeitig nach außen gelangen (Abb. 13).

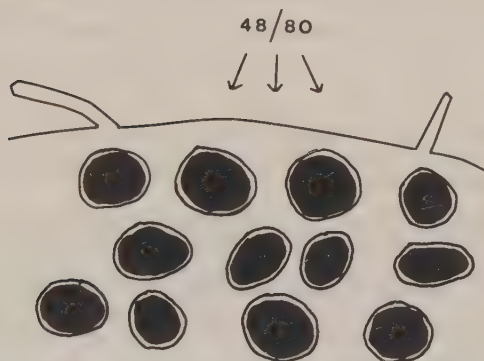
Uvnäs und Mitarbeiter sind der Meinung, daß die Histaminfreisetzung in mehreren Stufen abläuft.

- a. Eine Austreibung der histaminhaltigen Granula in das Zelläußere.
- b. Ein Elektrolytaustausch zwischen Histamingranula und Elektrolyten des Extrazellulärtraumes, wobei sich die Granula bis zu Tagen in der Umgebung aufhalten können. Dies zeigten sorgfältige Analysen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, die einmal den Vorgang der Granulafreisetzung bewiesen und gleichzeitig deren Verbleib in der unmittelbaren Umgebung der Zelle (Röhlich).

Röhlich und Mitarbeiter konnten ebenfalls beweisen, daß nach 48/80-Gabe strukturelle Veränderungen der Granula in den äußeren Zellschichten auftreten, ein Beweis, daß 48/80 an der Zellmembran wirkt (Abb. 13).

Um eine mehr quantitative Aussage über die Histaminfreisetzung in Kombination zu der biochemischen Bestimmung des Histamins mit histochemischen Verfahren zu erzielen, bedienten wir uns der Methode der Anfärbung der Mastzellen mit Toluidinblau. Toluidinblau, ein basischer Farbstoff geht ebenfalls wie Protaminsulfat, Azur I und Neutralrot eine Bindung mit den Sulfogruppen des Heparins ein. Wie Werle und Mitarbeiter

FREISETZER WIRKT AUF DIE MAST-
ZELLMEMBRAN



MAST- ZELLE DEGRANULIERT

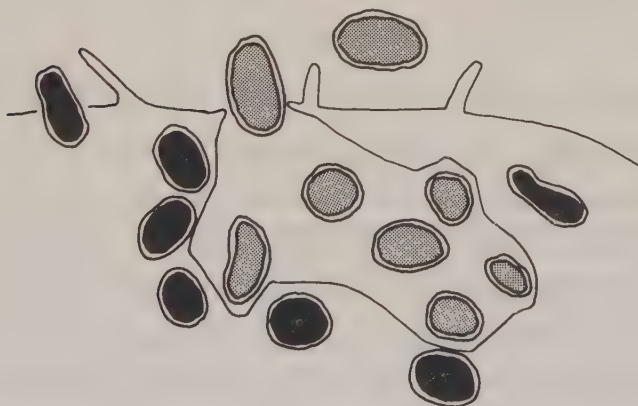


Abb. 13

48/80-Gabe führt an der Mastzelloberfläche zu strukturellen Veränderungen, so daß es zu einer Freisetzung der einzelnen Granula in die Umgebung der Zelle kommt.

(Nach Uvnäs und Mitarbeitern).

zeigen konnten, kommt es jedoch nicht zu einer Histaminfreisetzung durch Toluidinblau, da dieser Stoff als größeres Molekülaggregat in wässriger Lösung vorliegt, und nicht die Zellmembran durchdringen kann.

4.2. Histaminfreisetzung beim Hund durch Cremophor El unter Mitbeteiligung der Histaminspeicher

Cremophor El ist Lösungsvermittler verschiedener wasserunlöslicher Medikamente. Da es nach Applikation einiger dieser Stoffe zu heftigen Reaktionen vonseiten des Kreislaufs, der Lunge und der Haut gekommen war, wurde überlegt, welche Substanz für diese Reaktionen hauptverantwortlich sein kann.

Seit mehr als 30 Jahren ist von bestimmten Netzmitteln bekannt, daß sie beim Hund Histamin liberieren. Cremophor El ist ebenso wie die Tweene Abkömmling von Fettsäureestern. Wurde Cremophor El beim Hund intravenös injiziert, zeigten die Tiere Benommenheit, Bronchospasmus eine starke Hautreaktion in Form von Rötung, die mit heftigem Juckreiz verbunden sein mußte, denn die Tiere kratzten und scheuerten sich fortwährend. Diese Hautsymptome konnten leicht mit einer Histaminfreisetzung in Zusammenhang gebracht werden, denn Rötung, Quaddelbildung und Bronchospasmus werden oft bei Zwischenfällen gesehen, die mit einer massiven Histaminfreisetzung einhergehen.

Da es aber gleichzeitig nach Cremophor-Injektion zu Reaktionen vonseiten des Magen-Darmtraktes in Form von wässrigen Durchfällen kam, stellte sich auch hier die Frage, inwieweit eine Beteiligung des Histamins in Frage kommt.

Feldberg und Talesnik hatten festgestellt, daß nach Gabe von 48/80 Histamin beim Hund nur aus der Haut freigesetzt worden war, nicht jedoch aus dem Gastrointestinaltrakt. So kam es zu der Meinung, daß Histamin im Magen-Darmtrakt in Nichtmastzellspeichern gefunden wird, bzw. eine Lokalisation in atypischen Mastzellen angenommen wurde.

1969 bestätigten Lorenz und Mitarbeiter, daß die Mastzelle im Magen-Darmtrakt des Hundes atypische Mastzellen sind, d.h. Histamin dort nicht durch die typischen Histaminliberatoren wie 48/80 freigesetzt wird. In der Haut des Hundes befinden sich überwiegend typische Mastzellen, deren Kennzeichen neben der Fähigkeit, mit Toluidinblau bei pH 4,0 die Empfindlichkeit gegenüber 48/80 ist, während im Magen, Darm und Pankreas des Hundes überwiegend atypische Mastzellen zu finden sind, die sich mit Toluidinblau zwar bei pH 4,0 anfärben, aber gegenüber 48/80 resistent sind.

Da nun Cremophor beim Hund diese zweifache Wirkung zeigte, wurde von uns gleichzeitig der Histamingehalt und die Mastzellzahl in den verschiedenen Geweben gemessen. Es fand sich eine signifikante Korrelation in der Abnahme des Histamingehaltes zur Verringerung der Mastzellzahl in den verschiedenen Geweben.

Somit wurde mit Cremophor El der erste Stoff gefunden, der Histamin beim Hund sowohl aus der Haut als auch aus dem Gastrointestinaltrakt freisetzt, bezogen auf die Mastzellspeicher des Histamins sowohl aus atypischen als auch aus typischen Mastzellen freigesetzt wurden.

Durch Cremophor El haben wir die Möglichkeit, mehr über den Mechanismus der Liberierung von Histamin aus den Mastzellen in Erfahrung zu bringen.

4.3. Histaminfreisetzung beim Schwein unter Mitbeteiligung der Histaminspeicher

Das Schwein ist in der Medizin ein sehr begehrtes Laboratoriumstier geworden, denn es zeigte sich, daß sowohl in der Physiologie als auch in der Pathophysiologie sehr häufig menschenähnliche Reaktionen gesehen werden können.

In unserer Arbeit interessierte uns der Histaminstoffwechsel des Schweines und seine pathophysiologische Bedeutung. Bekannt ist, daß in den meisten Organen des Schweines ein hoher Histamingehalt anzutreffen ist, und daß die Enzyme des Histaminstoffwechsels bei dieser Spezies besonders aktiv sind, so z. B. die Histidindecaboxylase des Magens (Lorenz et al. 1969 b und 1969 c) und der Schilddrüse (Werle und Lorenz 1966; Lorenz und Werle 1967), die Diaminoxidase der Niere (Kapeller-Adler 1960; Mondovi 1964) und die Histaminmethyltransferase von der Leber (Lindal, 1960) und Magen (Lorenz et al. 1970 und 1970 a). Unser Interesse galt besonders den Histaminspeichern des Schweines, speziell des Magen-Darmtraktes, über die bis heute recht wenig ausgesagt worden ist. Auch muß heute eine Unterteilung der Mastzellen anhand ihrer Fixierbarkeit mit Formaldehyd, wie es von Enerbäck 1966 vorgenommen wurde, als unrichtig angesehen werden, denn Schweinemastzellen verhalten sich bei Formolfixierung wie atypische Mastzellen.

Wichtig war es für uns, Klarheit in die Histaminspeichertheorien hinein-zubringen, auch wenn es bis heute unmöglich ist, die verschiedenen Arten der Histaminspeicher in ihrer Funktion zu unterscheiden. Ähnlich wie bei dem System der endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes sollte versucht werden, die Mastzellen anhand ihrer histochemischen Fluoreszenz, der mikroskopischen, elektronenmikroskopischen und pharmakologischen Eigenschaften zu beschreiben, um sie dann später in spezielle Gruppen aufzuteilen, die dann eher zur physiologischen Aufklärung der Histaminspeicher führen kann.

Es gelang uns, die Mastzellen in allen Schweineorganen sichtbar zu machen, indem wir an Stelle von Formalin die Organstücke mit Carnoy'scher Lösung fixierten, um sie anschließend mit Toluidinblau anzufärben. Somit wurden Riley und West widerlegt, die aufgrund einer falschen Fixierung keine Mastzellen in Schweineorganen fanden und dann behaupteten, daß das gefundene Histamin im Verdauungstrakt des Schweines in Nichtmastzell-speichern lokalisiert sein müsse.

Unsere Ergebnisse der biochemisch und histochemischen Studien zeigen, daß das Histamin im Verdauungstrakt des Schweines vorwiegend in typischen Mastzellspeichern lokalisiert ist. (Jene Mastzellen waren als typisch beschrieben, die auf 48/80 Histamin liberierten).

Am häufigsten sind die typischen Mastzellen bei Hund und Ratte zu finden. Wie Lorenz und Mitarbeiter zeigen konnten, nahm nach 48/80-Behandlung der Histamingehalt im Magen-Darmtrakt des Schweines sehr stark ab. Dieses sprach damals schon dafür, daß auch das Schwein als Ausnahme unter den Säugern überwiegend typische Mastzellen im Magen-Darmtrakt enthalten mußte.

Die Erkenntnis, daß es ebenfalls Mastzellen sind, die Histamin in den Schweineorganen speichern, wurde gleichzeitig die Frage nach der speziellen Lokalisation dieser Mastzellen innerhalb der Organe aufgeworfen. Es war von Interesse, daß Mastzellen im Magencorpus und dort in der Nähe von Parietalzellen zu finden sind. Es läßt sich so die Hypothese, die Code aufstellte vielleicht beweisen, daß Histamin der universelle, finale Chemostimulator der Magensaft- und Säuresekretion ist, und zwar aus histochemischer Sicht.

Da nicht jede Parietalzelle ihre eigene Mastzelle in der Nähe hat, wäre es denkbar, daß das aus den einzelnen Mastzellen mit den Granula freigesetzte Histamin, sich so in die Umgebung ausbreitet, daß möglichst viele Parietalzellen stimuliert werden können. Da auch die Abnahme dieser Mastzellen in der Mucosa ziemlich groß war, kann angenommen werden, daß eine Beteiligung des Histamins an physiologischen Prozessen innerhalb des Magen-Darmtraktes vorhanden ist. Näheres kann nur durch gezielte, spezielle histologisch und biochemische Untersuchungen zu liefern sein.

6. Literaturverzeichnis

- BEAVEN, M.A., Z. HORAKOVA, H.L. JOHNSON, F. ERJAVEC und
B.B. BRODIE:
Selection labeling of histamine in rat gastric mucosa.
Federation Proc. 26, 233 (1967).
- BOOTH, N.H.:
Anesthesia in the pig.
Federation Proc. 28, 1547 (1969).
- BRODIE, B.B., M.A. BEAVEN, F. ERJAVEC und H.L. JOHNSON:
Uptake and release of H₃-Histamine.
Pergamon Press Oxford, pp 401 - 405 (1966).
- BURK, H.C.:
Histologische Technik.
Georg Thime-Verlag Stuttgart (1966).
- CODE, C.F. und W.T. IRVINE:
The output of HCl in gastric juice and free histamine in urine during
stimulation of gastric secretion.
J. Physiol. 133, 52 P (1956).
- CODE, C.F., M.M. HURN und R.G. MITCHELL:
Histamine in human disease.
Mayo Clinic Proceedings 39, 715 (1964).
- CODE, C.F.:
Histamine and gastric secretion.
Gastroenterology 51, 272 (1966).
- COPENHAVER jr., J.H., M.E. NAGLER und A. GOTH:
The intracellular distribution of histamine.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 109, 401 - 406 (1953).
- DOUGLAS, W.W.:
Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin
and other cells.
Br. J. Pharmacol. 34, 451 - 474 (1968).
- EHRlich, P.:
Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbung und ihrer Verwendung in
der mikroskopischen Forschung.
Arch. mik. Anat., 263 - 277 (1877).
- ENERBÄCK, L.:
Mast cells in rat gastrointestinal mucosa.
Acta path. et microbiol. scand. 66, 303 - 312 (1966).

FAWCETT, D.W.:

Cytological and pharmacological observations on the release of histamine by mast cells.

J. Exp. Med. 100, 217 - 224 (1954).

FAWCETT, D.W.:

An experimental study of mast cell degranulation and regeneration.

Anat. Rec. 121, 29 - 52 (1955).

FELDBERG und TALESNIK:

Reduction of tissue histamine by compound 48/80.

J. Physiol. 120, 550 (1953).

GRAHAM, H. T., T. W. HANNEGAN und C. M. NURSE:

Dependence of tissue histamine content on local histidine decarboxylase activity.

Biochem. Biophys. Acta 20, 243 (1956).

GRAHAM, H. T., J. A. D. SCARPELLINI, B. P. NUBKA und O. H. LOWRY:

Measurement and normal range of free histamine in human blood plasma.

Biochem. Pharmacol. 17, 2271 - 2280 (1968).

HAKANSON, R.:

Formation of amines in the gastric mucosa of the rat.

Nature 208, 793 - 794 (1965).

HAKANSON, R., B. LILJA und C. OWMAN:

Properties of a new system of amine-storing cells in the gastric mucosa of the rat.

Europ. J. Pharmacol. 1, 188 - 199 (1967).

JORPES, HOLMGREN und WIELANDER:

Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen.

Z. mikr.-anat. Forsch. 42, 275 - 300 (1937).

JOHNSON, A. R., N. C. MORAN:

Release of histamine from rat mast cells; A comparison of the effects of 48/80 and two antigen-antibody systems.

Fed. Proc. 28, 1716 (1969).

JOHANSON, T., N. CHAKRAVARTY:

The Utilization of Adenosine Triphosphate in Rat Mast Cells during

Histamine Release induced by Anaphylactic Reaction and Compound 48/80

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 243 - 260 (1975).

KAPELLER-ADLER, H.:

Studies on Histaminase.

Biochem. J. 44, 70 - 77 (1949).

LAGUNOFF, D., M. T. PHILIPS, O. A. ISERI und E. P. BENDITT:

Isolation and preliminary characterization of rat mast cell granules.

Lab. Invest. 13, 1331 (1964).

LINDAHL, K. M.:

The histamine methylating enzyme system in liver.
Acta Physiol. Scand. 49, 114 - 138 (1960).

LORENZ, W. und E. WERLE:

Zur Bestimmung der spezifischen Histidindecaboxylase.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 319 (1967).

LORENZ, W., St. HEITLAND, E. WERLE, A. SCHAUER und H. GASTPAR:

Histamin in Speicheldrüsen, Tonsillen und Thymus und adaptive Histaminbildung der Glandula submaxillaris.
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 319 (1968).

LORENZ, W. und E. WERLE:

Inhibition of the salivary secretion by antihistaminic drugs and the question of a physiological role of histamine in the submaxillary and parotid gland.
Abstr. 4th Intern. Congr. on Pharmacol., Basel, p. 363 (1969).

LORENZ, W., A. SCHAUER, St. HALBACH, R. CALVOER und E. WERLE:

Biochemical and histochemical studies in the distribution of histamine in the digestive tract of man, dog and other mammals.
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmac. exp. Path. 265, 81 (1969).

LORENZ, W., St. HALBACH und E. WERLE:

Specific histidine decarboxylase in the gastric mucosa of man and other mammals: determination, location and properties.
Biochem. Pharmacol. 18, 2625 (1969 a).

LORENZ, W., A. SCHAUER, St. HALBACH, E. MATEKJA und E. WERLE:

Biochemical and histochemical studies on histamine in the digestive tract: distribution in different chordates and cellular stores in the dog.
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmak. exp. Path. 264, 274 (1969 b).

LORENZ, W., St. HALBACH, M. GERANT und E. WERLE:

Specific histidine decarboxylases in the gastric mucosa of man and other mammals: determination, location and properties.
Biochem. Pharm. Vol. 18, pp 2625 - 2637 (1969 c).

LORENZ, W., H. BARTH und E. WERLE:

Histamine and histamine methyltransferase in the gastric mucosa of man, pig, dog and cow.
Naunyn-Schmied. Arch. Pharm. exp. Path. 267, 421 (1970).

LORENZ, W., L. BENESCH, H. BARTH, E. MATEKJA, R. MEYER, J. KUSCHE, M. HUTZEL und E. WERLE:

Fluorometric assay of histamine in tissues and body fluids: Choise of the purification procedure and identification in the nanigram range.
Z. Anal. Chem. 252, 94 (1970 a).

LORENZ, W., H. BARTH, J. KUSCHE, H. J. REIMANN, A. SCHMAL, E. MATEKJA, Ch. MATHIAS, M. HUTZEL und E. WERLE:

Histamine in the Pig. Determination, Distribution, Release and Pharmacological Actions.
Europ. J. of Pharmacol. 14, 155 (1971).

LORENZ, W., A. SCHAUER und H. J. REIMANN:

Biochemical and histochemical studies on the histamine stores in the pig. Biochemische und histochemische Untersuchungen über die Histaminspeicher beim Schwein.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 269, 416 (1971 a).

LORENZ, W., R. MEYER, A. DOENICKE, A. SCHMAL, H. J. REIMANN, M. HUTZEL und E. WERLE:

On the species specificity of the histamine release from mast cell stores by Cremophor-El.

Zur Speziespezifität der Histaminfreisetzung aus Mastzellspeichern durch Cremophor-El.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 269, 417 (1971 b).

LORENZ, W., M. THERMANN, H. HAMELMANN, A. SCHMAL, D. MAROSKE, H. J. REIMANN, J. KUSCHE, F. SCHINGALE, P. DORMANN und P. KECK:

Influence of H₁- and H₂-receptor antagonists on the effects of histamine in the circulatory system and on plasma histamine levels.

Int. Symposium on Histamine H₂-Receptor Antagonists,

Editors: Clive J. Wood, D. Phil., M. Alison Simkins, Ph.D.,

M. I. Inf. Sc., Deltakos (UK) Ltd. London, W1. p. 151 (1973).

Mac INTOSH, F. C. und W. D. M. PATON:

The liberation of histamine by certain organic bases.

Physiol. (London) 109, 190 (1949).

MONDOVI, B., G. ROTILIO, A. FINAZZI und A. SCIOSCIA-SANTORO:

Purification of pig-kidney diamine oxydase and its oxdentity with histaminase.

Biochem. J. 91, 408 (1964).

OJERS, F., C. A. HOLME und C. A. DRAGSTEDT:

The relation of the liver histamine to anaphylactic shock in dogs.

J. Pharmacol. exp. Therp. 73, 33 (1941).

PADAWER, J. und G. J. FRUMAN:

Phagocytosis of zymosan particles by mast cells.

Experientia (Basel) 24, 471 (1968).

PADAWER, J.:

The reaction of rat mast cells to polylysine.

J. Cell-Biol. 17, 352 (1970).

REIMANN, H. J.:

Histaminfreisetzung bei Schwein, Hund und Mensch.

Dissertation Univ. Marburg (1973).

RILEY, J. F. und G. B. WEST:

The presence of histamine in tissue mast cells.

J. Physiol. (London) 120, 528 (1953).

RILEY, J. F. und G. B. WEST:

A binding site for histamine in dog pyloric mucosa.

Experientia (Basel) 12, 153 (1956).

RILEY, J.F.:

The mast cells.

Livingstone, Edinburg (1959).

RÖHLICH, Pal, P. ANDERSON und B. UVNÄS:

Electron Microscope observations on compound 48/80 induced degranulation in the rat mast cells.

The Journal of Cell-Biol., Vol. 51, 465 - 483 (1971).

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik.

R. Oldenbourg Verlag, München (1968).

RUBIN, R.P., M.B. FEINSTEIN, S.D. JAANUS und M. PAIMRE:

Inhibition of catecholamine secretion and calcium exchange in perfused cat adrenal glands by tetracaine and magnesium.

J. Pharmac. exp. Ther. 155, 463 - 471 (1967).

SCHAUER, A.:

Die Mastzelle.

Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1964).

SNEDECOR, G.W. und W.G. COCHRAN:

Statistical methods.

Iowa State University Press Am., p. '62 (1967).

UVNÄS, B. und I.-L. THON:

Evidence for enzymatic release from isolated rat mast cells.

Exp. Cell Res. 23, 45 - 57 (1961).

UVNÄS, B., P. RÖHLICH und P. ANDERSON:

Electronmicroscope observations on compound 48/80 induced Degranulation in rat mast cells.

The Journal of Cell-Biol., Vol. 51, 465 - 483 (1971).

WERLE, E. und R. AMMAN:

Über eine Bindung des Histamins an Heparin.

Naturw. 21, 583 (1955).

WERLE, E. und R. AMMAN:

Zur Physiologie der Mastzellen als Träger des Heparins und Histamins.

Klin. Wschr. 34, 624 - 630 (1956).

WERLE, E. und W. LORENZ:

Histamin und Histidindecaboxylasen in Schilddrüsen und Thymus.

Biochem. Pharmacol. 15, 1059 (1966).

5. ZUSAMMENFASSUNG:

1. Cremophor El, ein Lösungsvermittler injizierbarer wasserunlöslicher Arzneimittel, wie z.B. Epontol^R, Althesin, Marcumar^R u.a., löst beim Hund zum Teil heftige Reaktionen in Form von Blutdruckabfall, Bronchospasmus, Zyanose und Rötung verschiedener Hautareale aus. Durch fluorometrische Bestimmung des Histamingehaltes verschiedener Gewebe des Hundes fanden sich sowohl eine Abnahme des Histamingehaltes der Haut als auch der des Gastrointestinaltraktes.

2. Mit Toluidinblau, einer Spezialfärbung für Mastzellen wurde versucht, die Histaminspeicher in den Hundeorganen sichtbar zu machen. Es sollte herausgefunden werden, ob die Abnahme des Histamingehaltes parallel mit der Abnahme der Anzahl der Mastzellen einhergeht. Das Ergebnis zeigte eine Korrelation zwischen dem Histamin und der Anzahl der Mastzellen in denselben Organen. Mit Cremophor El konnte ein Histaminliberator gefunden werden, der beim Hund sowohl aus typischen als auch atypischen Mastzellen Histamin freisetzt.

3. Durch Applikation von 48/80 konnte beim Schwein Histamin aus den verschiedenen Organen liberiert werden, das fluorometrisch gemessen wurde.

4. Mit den herkömmlichen Fixier- und Färbemethoden war es bisher nicht gelungen, Mastzellen im Gastrointestinaltrakt des Schweines sichtbar zu machen. Andere Autoren wie z.B. Riley und West waren daher der Ansicht, daß es sich im Magen-Darmtrakt des Schweines um nicht-

mastzellgespeichertes Histamin handeln müsse. Da wir durch Gewebebestimmungen das Histamin fluorometrisch im Magen-Darmtrakt des Schweines gemessen hatten, stellte sich für uns die Aufgabe, zu versuchen, die Histaminspeicher sichtbar zu machen. Dies gelang durch Änderung der Fixierung, indem an Stelle von Formalin Carnoy und Bleiacetat verwendet wurde. Färbte man nun die 5 μ dicken Gewebeschnitte mit Toluidinblau, konnten Mastzellen sowohl in der Schleimhaut als auch in der Muscularis mucosae und Muscularis sichtbar gemacht werden.

Herrn Prof. Dr. W. Lorenz danke ich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. H. - J. Reimann aussprechen, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand.

Seine freundschaftliche Unterstützung, die begeisternden konzentrierten Diskussionen mit ihm sind mir unvergeßlich und werden mir für meinen beruflichen Weg sehr dienlich sein.

Weiterhin gilt mein Dank Frl. Schülle, Herrn Schmal und Herrn Prof. Dr. P. Schmitz-Moormann.

Lebenslauf

Am 17.09.1944 wurde ich in Seiffen/Erzgebirge als Sohn der Eheleute Gertrud und Willi Hoerkens geboren. Ab 1950 besuchte ich die Grundschule in Augsburg, wechselte dann in das Gymnasium St. Thomas der Dominikaner in Vechta/Oldenburg und legte 1965 dort die Reifeprüfung ab. Meiner Wehrpflicht genügte ich 1965 und 1966 in Lüneburg. Nach kurzem Studium von Geschichte und Philosophie begann ich 1967 mit dem Studium der Medizin in Marburg. Längere Krankheit verzögerte das Studium, das ich am 20.08.1974 in Marburg erfolgreich beenden konnte.

Während der klinischen Semester erhielt ich eine Doktorarbeit an der Abteilung für experimentelle Chirurgie und pathologische Chemie (Direktor: Prof. Dr. W. Lorenz) der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg (Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann).

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich in Marburg an der Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini), an der Gynäkologisch-Geburtshilflichen Klinik des Bürgerhospitals Frankfurt/M. (Direktor: Prof. Dr. H. Wagner) und in der Chirurgischen Klinik desselben Hauses (Direktor: Prof. Dr. G. Vetter) ab.

Am 08.09.1975 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit 1975 bin ich Assistenzarzt in der Gynäkologisch-Geburtshilflichen Klinik des Bürgerhospitals in Frankfurt/M. (Direktor: Prof. Dr. H. Wagner).

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arndt, Barthelmai, Berendes, Bichler, Bommer, Brasch, Brück, Buchholz, Busch, Castenholz, Daume, Dimroth, Dölle, Eissner, Engelhardt, Exner, Friederich, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Graul, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hort, Ihm, Jacob, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Klein, Knauff, Koch, Koecke, Koransky, Kühnel, Kuni, Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mahr, Mann, Maroske, Martini, Neurath, Nöth, Nultsch, Petry, Pots, Reim, Richter, Rodeck, Rohen, Schaumlöffel, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Straub, Strohmeyer, Stuke, Stutte, Thoenes, Van der Zypen, von Stosch, Walcher, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Wiegandt, Willenbockel.

